

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①1 N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 699 678

②1 N° d'enregistrement national :

92 15589

⑤1 Int Cl⁵ : G 01 N 21/64//A 61 K 35/52

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 23.12.92.

③0 Priorité :

⑦1 Demandeur(s) : UNION NATIONALE DES
COOPERATIVES AGRICOLES D'ELEVAGE ET
D'INSEMINATION ARTIFICIELLE (U.N.C.E.I.A.) — FR
et UNION DE SOCIETES COOPERATIVES
AGRICOLLES (Agrément ministériel no 107).

⑦2 Inventeur(s) : Merlu Benoît.

④3 Date de la mise à disposition du public de la
demande : 24.06.94 Bulletin 94/25.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule.*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire : U.N.C.E.I.A.

⑤4 Procédé cytométrique de séparation de spermatozoïdes X et Y en fonction de leur contenu en ADN.

⑤7 Un procédé cytométrique de séparation de spermatozoïdes mâles et femelles en fonction de leur contenu en ADN.

Les spermatozoïdes sont colorés par un fluorochrome spécifique de l'ADN respectant la viabilité des cellules. Les spermatozoïdes sont analysés par un cytomètre en flux dont l'énergie d'excitation du fluorochrome est fournie par une lampe à vapeur de mercure et dont la cellule d'analyse est conçue de façon à ce que la mesure de fluorescence des spermatozoïdes ne soit pas influencée par l'orientation des cellules dans le flux. Les spermatozoïdes du sexe désiré sélectionnés sur les cytogrammes sont triés et récupérés de façon à être utilisés dans des techniques de procréation animale médicalement assistée.

FR 2 699 678 - A1



La présente invention concerne un procédé permettant de séparer des spermatozoïdes mâles et femelles en fonction de leur contenu en ADN, en vue de leur utilisation dans le domaine des biotechnologies animales de procréation médicalement assistée.

Les spermatozoïdes mâles et femelles se caractérisent par une différence de contenu en
5 ADN du simple fait que les spermatozoïdes mâles contiennent un chromosome Y et les femelles un chromosome X. Le chromosome Y est légèrement plus petit que le chromosome X avec une différence de l'ordre de 3,5 à 4,5% en ADN de l'ensemble du génome, et ceci chez la plupart des espèces de mammifères. L'utilisation de fluorochromes marquant de façon stoechiométrique l'ADN rend possible une analyse quantitative de l'ADN présent dans une population de
10 spermatozoïdes par l'intermédiaire d'un appareil de cytométrie en flux, de manière à différencier les sous-populations de spermatozoïdes mâles et femelles. Les spermatozoïdes de sexe déterminé peuvent être récupérés par la partie trieur de l'appareil et utilisé pour des inséminations ou des fécondations in vitro. L'utilisation de la cytométrie en flux dans le but de séparer des spermatozoïdes X et Y a fait l'objet de deux prises de brevets WO 90/13303 et WO
15 90/13315. Dans ces brevets, la séparation des spermatozoïdes fait appel à l'utilisation d'un appareil de cytométrie en flux dont l'excitation en lumière ultraviolette est produite par un laser à argon ayant une puissance de 5 watt. Ce type de laser a l'inconvénient d'être encombrant, couteux, difficile à mettre en oeuvre, et nécessite de plus une infrastructure particulière pour permettre le refroidissement par eau. Ces appareils sont conçus pour analyser les
20 spermatozoïdes dans un flux vertical dans un système ouvert vers l'extérieur où se fait l'excitation des fluorochromes par le laser. Ces appareils, dans leur conception première sont sensibles à l'orientation des spermatozoïdes par rapport à l'incidence du faisceau laser au moment de l'excitation. Ceci conduit à une représentation bimodale sur les cytogrammes avec une quantité de spermatozoïdes orientés la face plane perpendiculaire au laser de l'ordre de 20%. Ce
25 phénomène est rencontré à chaque fois que l'on analyse des cellules non sphériques et en particulier des cellules planes telles que les spermatozoïdes [Gledhill et al, J. Cell. Physiol. 87: 367-376 (1976)]. Pour remédier à ce problème, il a été proposé une modification du cytomètre [Johnson et al, Cytometry 7: 268-273 (1986)]. Le système consiste à remplacer dans l'appareil conventionnel, le détecteur de diffraction aux grands angles par un deuxième photomultiplicateur
30 situé à 90° par rapport au premier analyseur. Une deuxième modification consiste à utiliser une buse biseautée pour injecter les échantillons de façon à forcer les spermatozoïdes à s'orienter

dans le plan du faisceau laser, ce qui permet d'enrichir la fraction de spermatozoïdes bien orientés de 20 à 80%. Ensuite le deuxième photomultiplicateur situé à 90° par rapport au premier permet de réanalyser immédiatement la partie des spermatozoïdes bien orientés et de visualiser sur les cytogrammes une séparation des spermatozoïdes en deux populations X et Y.

5 Malheureusement, le système d'orientation par la buse biseautée n'est applicable que pour les spermatozoïdes morts [Johnson et al, Biol. Reprod. 41: 199-203 (1989)]. Une analyse reste néanmoins possible sur des cellules vivantes à partir des 20% de spermatozoïdes naturellement bien orientés, mais le rendement du tri devient alors très faible. Une autre méthode a été proposée [Métézeau et al, Mol. Reprod. Dev. 30: 250-257 (1991)], consiste en une orientation

10 optique des spermatozoïdes en utilisant deux lasers couplés sur le même appareil. Les résultats donnent une mauvaise résolution de la séparation des spermatozoïdes X et Y ainsi que de très mauvais rendements de l'ordre de 2%. Un autre inconvénient important rencontré lors de l'utilisation de ce type d'appareil est que le tri se fait dans un champ électrique après avoir chargé électriquement les cellules que l'on veut séparer alors que la charge électrique nuit à la

15 motilité des spermatozoïdes.

Le procédé de la présente invention permet de remédier à ces inconvénients. Le cytomètre en flux utilisé dans ce procédé est basé sur un concept différent de ceux décrits précédemment. La première différence remarquable est la substitution du laser UV par une lampe à vapeur de mercure identique à celles utilisées dans les microscopes à épifluorescence. Ce

20 système est peu encombrant, peu couteux et ne nécessite aucune infrastructure tel que le refroidissement par eau dans le cas des lasers précités. En outre, l'analyse des spermatozoïdes est effectuée dans une cellule d'analyse métallique, dont le centre est creusé par un canal dans lequel se crée le flux laminaire entraîné par un liquide de gaine qui entoure l'échantillon, lui-même injecté par une buse située à l'entrée du canal. Le canal est recouvert d'une lamelle en

25 verre au niveau de laquelle se situe un objectif qui analyse la fluorescence émise par les spermatozoïdes. De part sa conception, cette cellule d'analyse reflète la lumière fluorescente émise par le spermatozoïde dans toutes les directions et envoie à l'objectif une quantité de fluorescence indépendante de l'orientation des spermatozoïdes dans le flux laminaire. L'analyse porte donc sur la quasi totalité des spermatozoïdes et non sur 20% des spermatozoïdes dans les

30 autres méthodes, d'où un rendement supérieur au moment du tri des spermatozoïdes. La population de spermatozoïdes X ou Y est repérée sur le cytogramme et séparée directement au

niveau de la cellule d'analyse par une valve dirigée par un quartz piezo-électrique situé à l'intérieur du canal d'analyse. Celle-ci provoque une perturbation hydrodynamique du flux et oriente le spermatozoïde repéré vers un canal adjacent aboutissant à un tube de récupération. Le tri n'est limité que par la vitesse de mouvement de la valve qui est en général de l'ordre de 1000 spermatozoïdes par seconde. Ce tri a l'avantage de conduire à des spermatozoïdes n'ayant pas eu à subir le traumatisme d'une charge électrique comme c'est le cas dans les autres appareils, et conduit à la récupération de spermatozoïdes ayant une bonne motilité. La majeure partie de ces caractéristiques se retrouvent dans le cytomètre en flux PAS III (PARTEC GmbH, Münster, Allemagne). L'utilisation de cet appareil n'est en aucun cas limitatif du procédé de cette invention et l'emploi de tout appareil ayant des caractéristiques similaires peut convenir à la mise en oeuvre de ce procédé sans en altérer le caractère inventif.

Le tri des spermatozoïdes se fait dans le but d'aboutir à des procréations animales médicalement assistées telles que l'insémination artificielle, l'insémination chirurgicale ou la fécondation in vitro. Il est donc fondamental que l'ensemble des étapes de ce procédé se déroule dans des colorants et des milieux permettant de garder les spermatozoïdes vivants, motiles et féconds. Pour cela nous avons choisi comme colorant de fluorescence le Hoechst 33342 (Calbiochem, San Diego, CA, Etats-Unis) qui est un agent intercalant des bases A et T de l'ADN, excitable dans l'UV, qui ne nuit ni à la viabilité cellulaire, ni au pouvoir fécondant des spermatozoïdes, et qui n'a pas d'effet tératogène sur la descendance aux concentrations généralement utilisées en cytométrie en flux [Morrell et al, Mut. Res. 224: 177-183 (1989)]. Le tampon de coloration des spermatozoïdes et le liquide de gaine sont des solutions isotoniques respectant la motilité des spermatozoïdes.

Les spermatozoïdes provenant de paillettes congelées dans l'azote liquide ou provenant d'éjaculats frais, sont dilués dans un tampon Tris isotonique pour obtenir une concentration finale de 10^6 spermatozoïdes/ml. La coloration des spermatozoïdes se fait par l'adjonction d'une quantité de Hoechst 33342 conduisant à une concentration finale de $1\mu\text{g/ml}$. La coloration est de 1 heure à 37°C . Les spermatozoïdes sont alors injectés dans le cytomètre à la vitesse de 600 spermatozoïdes/sec. La population de spermatozoïdes du sexe désiré est sélectionné sur le cytogramme sur lequel on visualise les deux sous-pics de fluorescence correspondant aux spermatozoïdes mâles et femelles par ordre de quantité d'ADN croissant. Les spermatozoïdes sont récupérés dans des tubes par fraction de 2 ml, puis concentrés par gravité, centrifugation ou

filtration. Les spermatozoïdes sont ensuite soumis à une étape d'enrichissement en spermatozoïdes motiles par migration ascendante, tamis moléculaire ou gradient de densité. Les spermatozoïdes motiles sont utilisés immédiatement pour des insémination chirurgicales ou des fécondations in vitro.

- 5 Des séparations de spermatozoïdes motiles de sexe déterminé ont été obtenus à partir de sperme de taureaux, de verrats, de béliers, de boucs, d'étalons, de chiens, mais ne constitue pas un caractère limitatif de l'invention quant à l'utilisation de ce procédé avec du sperme provenant d'autres espèces de mammifères.

- 10 Cette invention est destinée à produire une progéniture d'un sexe déterminé soit en particulier chez les bovins, la production de femelles dans les races à lait et la production de mâles dans les races à viande. De même le contrôle du sexe dans les techniques de biotechnologies liées à la reproduction conduit à une accélération de la sélection au sein d'une même race.

REVENDEICATIONS

1. Un procédé permettant de séparer des spermatozoïdes mâles et femelles de mammifères selon leur contenu en ADN comprenant les étapes suivantes :
- 5 a) marquer les spermatozoïdes avec un fluorochrome se fixant de façon stoechiométrique sur l'ADN et n'affectant pas la viabilité des cellules;
- b) faire passer les spermatozoïdes dans un cytomètre en flux, dont le flux laminaire est réalisé à l'intérieur d'un canal métallique dont les surfaces réfléchissent la lumière dans toutes les directions;
- 10 c) analyser les spermatozoïdes par un objectif directement situé au niveau de la surface supérieure du canal qui permet à la fois l'excitation de l'ADN par l'intermédiaire d'une lampe à vapeur de mercure, ainsi que la quantification de l'ADN de chaque spermatozoïde par l'intermédiaire d'un photomultiplicateur;
- d) diriger les spermatozoïdes ayant la quantité de fluorescence correspondant au sexe
- 15 désiré vers un canal adjacent à l'aide d'une valve présente sur la cellule d'analyse;
- e) récupérer les spermatozoïdes en vue de les utiliser pour des inséminations artificielles, des fécondations in vitro ou tout autre procédé de procréation.
2. Un procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le fluorochrome est un agent intercalant de l'ADN.
- 20 3. Un procédé selon les revendications 1 et 2, caractérisé en ce que le fluorochrome se fixe sur les bases A et T de l'ADN et est excitable par la lumière ultraviolette.
4. Un procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que les spermatozoïdes proviennent de taureaux, de verrats, de béliers, de boucs, d'étalons, de chiens, de lapins.
5. Un procédé selon les revendications 1, caractérisé en ce que le canal métallique de la
- 25 cellule d'analyse permet de réfléchir la fluorescence dans toutes les directions de façon à ce que la valeur globale de la quantité d'ADN analysée ne soit pas influencée par l'orientation du spermatozoïde dans le flux.
6. Un procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la valve animée par un quartz piezo-électrique situé dans le canal de la cellule d'analyse produit une perturbation
- 30 hydrodynamique permettant de diriger les spermatozoïdes du sexe déterminé vers un canal adjacent.

7. Un procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que les spermatozoïdes sont analysés et recueillis dans un tampon assurant la viabilité et la motilité des spermatozoïdes.

8. Un procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que les spermatozoïdes triés sont concentrés avant d'être utilisés pour des fécondations in vitro du sexe désiré.

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
Y	US-A-5 135 759 (JOHNSON) 4 Août 1992 * colonne 2 - colonne 5 * ---	1-5
Y	GB-A-2 206 707 (MEDICAL RESEARCH) 11 Janvier 1989 * page 3 - page 6; figures 3,4 * ---	1-5
Y	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 10, no. 140 (P-458)(2197) 23 Mai 1986 & JP-A-60 260 830 (FUJISAWA YAKUHIIN) 24 Décembre 1985 * abrégé * ---	1,5
Y	US-A-3 788 744 (FRIEDMAN ET AL.) 29 Janvier 1974 * colonne 6 - colonne 8; figure 2 * ---	1,5
A	MOLECULAR REPRODUCTION AND DEVELOPMENT vol. 30, no. 3, 1 Novembre 1991, pages 250 - 257 METEZEAU ET AL. 'IMPROVEMENT OF FLOW CYTOMETRY ANALYSIS AND SORTING, ETC.' * page 253 - page 256 * ---	1
A	CYTOMETRY vol. 7, 1 Décembre 1986, pages 268 - 273 JOHNSON ET AL. 'MODIFICATION OF A LASER BASED FLOW CYTOMETER, ETC.' ---	1-4
Y,D	'JOURNAL OF CELL PHYSIOLOGY vol. 87, 1 Mars 1976, pages 367 - 375 GLEDHILL ET AL. 'FLOW MICROFLUOROMETRIC ANALYSIS OF SPERM DNA CONTENT, ETC.' ---	1
-/--		
Date d'achèvement de la recherche 23 SEPTEMBRE 1993		Examinateur BOEHM C.E.

CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		
X : particulièrement pertinent à lui seul	T : théorie ou principe à la base de l'invention	
Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie	E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure.	
A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général	D : cité dans la demande	
O : divulgation non-écrite	L : cité pour d'autres raisons	
P : document intercalaire	& : membre de la même famille, document correspondant	

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
Y	US-A-4 348 107 (LEIF) 7 Septembre 1982 * colonne 5 - colonne 6; figure 2 * -----	1
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.5)
Date d'achèvement de la recherche 23 SEPTEMBRE 1993		Examinateur BOEHM C.E.
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>		